UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT DES CEFOTAXIMS IN EINGEFRORENEN PROBEN

Ulrich van Laak

Diss. Frankfurt
1984

UNIV.
LEIDEN
LIBR.

Aus dem Zentrum der Hygiene der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Hans Knothe)

Untersuchungen zur Stabilität des Cefotaxims in eingefrorenen Proben

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Ulrich van Laak
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main 1984

Meiner Frau Jacqueline
gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523703_0015

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
2	Material	3
2.1	Chemikalien	3
2.2	Antibiotikum	3
2.3	Nährboden	3
2.4	Bakterienstamm	5
2.5	Speichel	5
2.6	Serum und Plasma	5
2.7	Urin	5
2.8	Galle	5
2.9	Muskulatur	6
2.1o	Erythrozyten	6
3	Methode	7
3.1	Agar	7
3.2	Pufferlösung	7
3.3	Speichel	7
3.4	Serum und Plasma	8
3.5	Urin	8
3.6	Galle	8
3.7	Muskulatur	9
3.8	Erythrozytensuspension	1o
3.9	Agardiffusionstest	11
3.1o	Herstellen der Agarplatten	12
3.11	Eichkurven	13
3.12	Standardkonzentrationen	14
3.13	Proben	15
3.14	Auswertung	16

		Seite
4	Ergebnisse	17
4.1	Eichkurven	17
4.2	Speichel	19
4.3	Serum	19
4.4	Plasma	2o
4.5	Urin	2o
4.6	Galle	2o
4.7	Muskulatur	22
4.8	Erythrozyten	24
5	Diskussion	29
6	Zusammenfassung	35
7	Literaturverzeichnis	36

1. Einleitung

Die Cephalosporine haben sich in den letzten Jahren als die entwicklungsfähigste Substanzklasse der Antibiotika erwiesen. Zwischen den meisten der modernen Cephalosporine bestehen in bezug auf die klinische Wirksamkeit nur unwesentliche Unterschiede. Der Wirkungsbereich ist insgesamt gegenüber den alten Cephalosporinen erweitert (Drasar 1978, Hamilton-Miller 1978, O'Callaghan 1979, Shah 1979, Neu 198o).

Cefotaxim entspricht hinsichtlich seines Spektrums und seiner in-vitro-Aktivität der Gruppe 4 der Cephalosporine nach Knothe/Dette (Heymès 1977, Drasar 1978, Hamilton-Miller 1978, Fu 1979, Neu 1979, Knothe 198o (a), Mitsuhashi 198o, Schrinner 198o).

Neben dem Wirkungsspektrum müssen zur Beurteilung der antibakteriellen Wirksamkeit am Ort der Infektion noch andere wesentliche Parameter beachtet werden. Die Probleme der Bindung, der Penetrationsfähigkeit, der Stabilität (beispielsweise gegenüber Enzymen), der Pharmakokinetik, des pH-Wertes und der Temperatur sind bei der Beurteilung der in-vivo-Wirksamkeit zu berücksichtigen.

Bei den üblichen Methoden zur Bestimmung des Antibiotikumspiegels aus Gewebeproben werden die Strukturelemente des Gewebes, z.B. Zellen oder Zellmembranen zerstört. Daher können verschiedenartige Störfaktoren, sowohl aus dem extra-, als auch aus dem intrazellulären Raum, auf das zu bestimmende Antibiotikum einwirken (z.B. Enzyme, Blutbestandteile, Proteine) und seine Stabilität beeinflußen. Von besonderer Bedeutung ist die Einwirkung von Enzymen und Blutbestandteilen (Wise 1978, Chamberlain 198o, Wise 198o (a), Wright 198o).

UNIV. LEIDEN LIBR.

Während bei einem neuen Antibiotikum die Frage nach der in-vitro-Wirksamkeit vor dem klinischen Einsatz hinreichend abgeklärt ist (DIN 5894o 1976, Knothe 198o (b)) stellen sich mit der klinischen Anwendung oft neue Probleme hinsichtlich der Gewebekonzentration und der Stabilität (Wise 198o (b)).

Bei der Konzentrationsbestimmung eines Antibiotikums in menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten wird die entnommene Probe üblicherweise tiefgefroren und zur Verarbeitung versandt, um dann in entsprechenden Laboratorien tiefgefroren gelagert, aufgetaut und mikrobiologisch aufgearbeitet zu werden. Wesentlich für die Einwirkung von Störfaktoren auf das Antibiotikum ist die Zeitspanne, die zwischen Probenentnahme und Aufarbeitung vergeht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stabilität des Cefotaxims in eingefrorenen Proben des Menschen untersucht. Für Cefotaxim ergaben sich bereits in der ersten klinischen Prüfung sichere Hinweise für einen Abbau zum Desacetyl-Metaboliten (Wise 1978). Der Versuchsansatz beinhaltete Stabilitätsuntersuchungen in Speichel, Serum, Plasma, Urin, Galle, Muskulatur und Erythrozyten.

Eine derartige Untersuchung ist in der Literatur bisher nicht veröffentlicht worden.

2. Material

2.1. Chemikalien

Seesand wurde von der Firma Phywe bezogen.
Alle anderen Substanzen waren von p.a.-Qualität und wurden von üblichen Herstellern bezogen.

2.2. Antibiotikum

Cefotaxim lag als Natriumsalz vor: Claforan , Prüfbezeichnung HR 756, Firma Hoechst-AG, Frankfurt am Main, Bundesrepublik Deutschland.
Molekulargewicht: 477,5
Wertigkeit: 935 µg/ml
Summenformel: $C_{16}H_{16}O_7N_5S_2$-Na
Strukturformel: (s. Abbildung 1)

Desacetyl-Cefotaxim (Bezeichnung: R 025628 A, Charge B.1) lag ebenfalls als Natriumsalz vor. Es handelte sich um eine Spezialherstellung der Firma Hoechst-AG (s. oben) für Testzwecke.
Molekulargewicht: 435,5
Wertigkeit: 1ooo µg/ml

2.3. Nährboden

Für alle Versuche wurde Mueller-Hinton-Agar der Firma BBL Microbiology Systems Div. Becton Dickinson & Co., Cockeysville, USA, verwendet.
Zusammensetzung (Angaben laut Hersteller):
Beef Extractives (2,o g), Acidicase TM Pystone (17,5 g), Stach (1,5 g), Agar (17,o g).

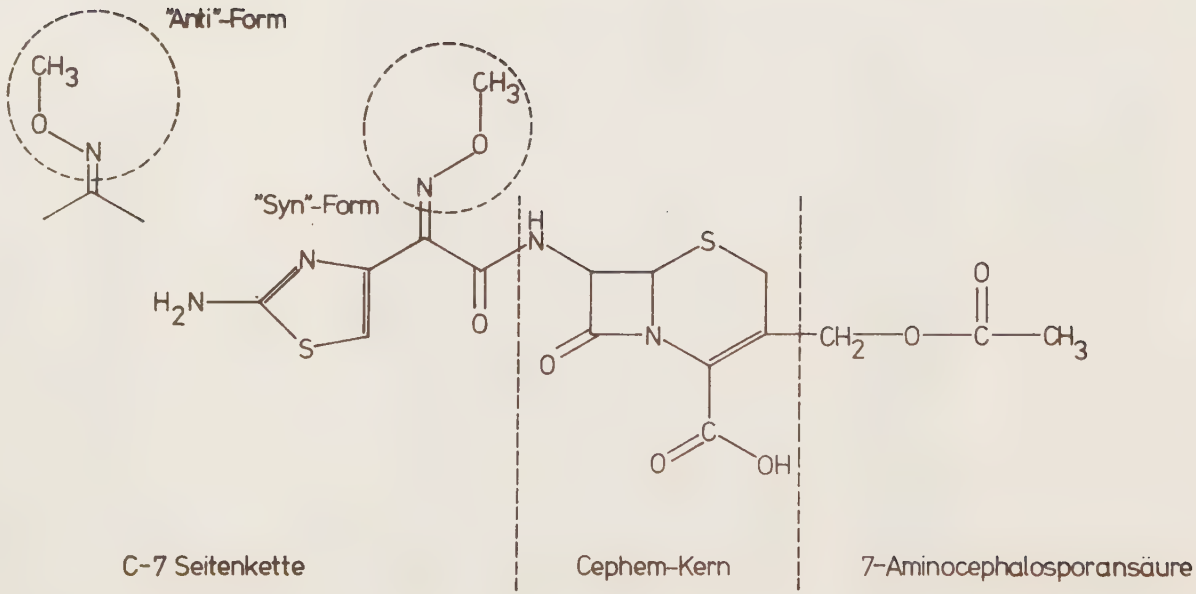

Abbildung 1: Cefotaxim, Strukturformel

2.4. Bakterienstamm

Als Testkeim diente ausschließlich Escherichia coli-Stamm 63-11/65 (Karimi 198o).

2.5. Speichel

Für diese Versuche wurde ausschließlich Sammelspeichel von gesunden, freiwilligen Personen verwendet.

2.6. Serum und Plasma

Serum und Plasma wurden auf herkömmliche Weise aus dem Vollblut gesunder, freiwilliger Spender gewonnen. Das Blut wurde erst unmittelbar vor Versuchsbeginn abgenommen.

2.7. Urin

Für diese Versuche wurde ausschließlich Sammelurin von gesunden, freiwilligen Personen verwendet.

2.8. Galle

Die sterile Galle wurde von Patienten gewonnen, die zur Entlastung der Gallenwege nach operativen Eingriffen am hepatobiliären System mit einem T-Drain versehen worden waren.
(Für die freundliche Unterstützung und die Bereitstellung ausreichender Mengen frischer Gallenflüssigkeit sei an dieser Stelle der Chirurgischen Abteilung des Nordwest-Krankenhauses Frankfurt am Main (Direktor Prof. Dr. med. E. Ungeheuer) herzlich gedankt).

2.9. Muskulatur

Bei den Muskulaturproben handelte es sich um Quadriceps femoris-Proben Verstorbener, deren Exitus nicht länger als 12 Stunden zurücklag und deren Todesursache bekannt war.
(Für die freundliche Unterstützung und die Hilfe bei der Gewinnung der Muskulaturproben sei an dieser Stelle dem Zentrum der Rechtsmedizin der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt (Direktor Prof. Dr. med. J. Gerchow) herzlich gedankt).

2.1o. Erythrozyten

Die Erythrozytenkonserven, jeweils am Vortage hergestellt, wurden vom Blutspendedienst Hessen des DRK bezogen und unmittelbar vor der Versuchsdurchführung gewaschen und gekühlt ins Labor transportiert.

3. Methode

3.1. Agar

Der Agardiffusionstest wurde mit Mueller-Hinton-Agar durchgeführt. Da bezüglich seiner Zusammensetzung, je nach Charge, Unterschiede bestehen, fand nur Agar Verwendung, der aus derselben Charge stammte (Freiesleben 1978, Grimm 1978, Wiedemann 1978, Karimi 198o, Knothe 198o (b), Krasemann 198o).

3.2. Pufferlösung

β-Lactamantibiotika werden im alkalischen Milieu durch enzymatische Hydrolyse zerstört (Sjöberg 1967, Cole 1969 (a)).
Deshalb wurde eine o,1molare Natrium-Kalium-Phosphatpufferlösung mit einem pH von etwa 6 bei 2o° C gewählt. Hierzu wurde o,1molare di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat Lösung ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, MG 177,99) mit o,1molarer Kaliumhydrogenphosphatlösung (KH_2PO_4, MG 136,o9) versetzt und entsprechend eingestellt.

3.3. Speichel

Den Spendern wurde eine Stunde vor Versuchsbeginn ein steriles Gefäß zum Sammeln von Speichel zur Verfügung gestellt. Der Sammelspeichel wurde anschließend mit Hilfe eines Bakterienfilters gefiltert. Das Filtrat diente als Ansatz für Proben und Standardkonzentrationen.

3.4. Serum und Plasma

Serum und Plasma wurden aus Spenderblut mittels Venenpunktion gewonnen und unmittelbar weiterverarbeitet und zur Herstellung von Ansätzen und Verdünnungsreihen verwendet.

3.5. Urin

Der Sammelurin wurde mit o,1 N Natronlauge und o,1 N Salzsäure auf die pH-Werte von 6,o; 6,5; 7,o; 7,5; 8,o eingestellt.

3.6. Galle

Für diese Versuche wurden nur Patienten ausgewählt, die sowohl prä- als auch postoperativ keine Antibiotika erhalten hatten. Dennoch wurden von jeder Probe Kontrollen auf antibiotische Eigenaktivität durchgeführt. Alle Patienten befanden sich in der Zeit nach dem 3. postoperativen Tag; der T-Drain war zur Aufrechterhaltung des Galleflusses im Gangsystem bereits zeitweise abgeklemmt. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Wahrscheinlichkeit einer operationsbedingten Blutung in die Gallenflüssigkeit gering. Die Gallenflüssigkeit wurde zu 1oo ml-Portionen in sterilen Beuteln aufgefangen. Bei einem Gallefluß von etwa 15 - 2o ml/h wurden die Auffangbeutel 5 Stunden vor der Aufarbeitung an den T-Drain angeschlossen, nachdem sie zuvor mit di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat-Kristallen (etwa 8 g) beschickt worden waren, damit eine spontane Alkalisierung der Galle abgepuffert werden konnte. Die Gallenflüssigkeit wurde gekühlt transportiert und vor der Aufarbeitung wegen ihrer Viskosität mit Pufferlösung im gleichen Verhältnis verdünnt. Die

anschließende pH-Messung ergab Werte zwischen 6,5 und 6,6. Die Pufferung mußte zudem erfolgen, weil Galle beim Einfrieren durch den Zerfall von kohlensauren Salzen alkalisch wird (bis hin zu pH 9,5), β-Lactamantibiotika aber ab einem pH-Wert von 8 durch Spaltung des β-Lactamringes zerstört werden. Bei diesem Prozeß sollen die Gallenfarbstoffe ursächlich beteiligt sein (Sjöberg 1967, Cole 1969 (a)).

3.7. Muskulatur

Durch die strenge Auswahl der Proben wurden Beeinflussungen durch postmortale Verschiebungen des Enzymmusters und andere, exogene Faktoren, wie z.B. Medikamenteneinnahmen weitestgehend vermieden. So kamen nur Proben von Personen infrage, die eines plötzlichen unerwarteten Todes gestorben waren und deren Todesursache eindeutig war.

Die Proben wurden jeweils aus der Oberschenkelmuskulatur entnommen, gekühlt und unmittelbar weiterverarbeitet. Dazu wurden genau 5 g Muskelgewebe auf der Feinwaage abgewogen und mechanisch mit der Schere auf etwa Reiskorngröße zerkleinert. Dann wurde zu der Muskelmasse sterilisierter feiner Seesand zugegeben und die Masse mit einem Porzellanmörser homogenisiert. Das Homogenat wurde dann für etwa eine Stunde mit dem, in Pufferlösung angesetzten Cefotaxim, bei 4° C inkubiert, indem die 5 g Muskelgewebe und Seesand mit 5 µl einer 2o µl Cefotaxim/ml enthaltenden Pufferlösung versetzt wurden und so die gewünschte Konzentration von 1o µl Cefotaxim/ml erreicht wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Masse für zehn Minuten bei 15o9xG zentrifugiert (Zentrifuge "Hettich Rotanta S"), sodaß sich der Seesand und die Zellbestandteile absetzten und der Überstand dekantiert werden konnte. Der pH-Wert der gewonnenen Lösung betrug 6,7 bis 7,2.

Bei diesem Versuch mit Muskulatur wurden die Standardkonzentrationen aus technischen Gründen nicht mit dem Gewebeeluat angesetzt, sondern es wurde Pufferlösung verwendet und gegen die Proben aufgetragen. Um der Methode Rechnung zu tragen, hätten die Standardlösungen mit einem Eluat des gleichen Materials wie die Proben angesetzt werden müssen (Plaue 1979), dies war aber wegen der relativ geringen Menge des gewonnenen Eluats nicht möglich. Eine antibakterielle Eigenaktivität des Materials wurde durch Parallelkontrollen ohne Antibiotikumzugabe ausgeschlossen. Ebenso wurde eine mögliche Beeinflussung des Versuches durch den Seesand ausgeschlossen.

Dazu wurde Seesand mit einer 1o µl Cefotaxim/ml enthaltenden Pufferlösung versetzt und die Rückgewinnungsrate sofort und nach 7 Tagen Frost festgestellt. Es konnten 1oo% des zugegebenen Antibiotikums wiedergewonnen werden (Konzentration unmittelbar 1o,65 µg/ml, nach 7 Tagen Frost 1o,33 µg/ml).

3.8. Erythrozytensuspension

Die gewaschene Erythrozytensuspension wurde in unterschiedlichen Konzentrationsstufen verdünnt (1:2; 1:4; 1:1o; 1:2o; 1:4o; $1:1o^2$; $1:1o^3$; $1:1o^4$; $1:1o^5$; $1:1o^6$). Die Erythrozytenkonzentration in gewaschenen Erythrozytenkonzentraten betrug 6,o - 8,o x $1o^6$/µl.

Die Herstellung der Standardkonzentrationen erfolgte, wie die Verdünnung der Proben, bei den Konzentrationsstufen bis zu 1:4o mit Pufferlösung und in einem Parallelversuch mit der entsprechenden Erythrozytensuspension dieser Verdünnungsstufe. Auf diese Weise sollten mögliche Abweichungen, die durch die Verwendung eines Standards mit anderer Zusammensetzung als derjenigen der Proben auftreten konnten, vermieden werden. Bei den Versuchen mit höher verdünnten Proben wurde dann nur noch mit gewaschenen Ery-

throzyten der gleichen Konzentrationsstufe verdünnt.

3.9. Agardiffusionstest

Bei der Modifikation des Agardiffusionstests zur Konzentrationsbestimmung, auch als "Lochtest" bekannt, besteht zwischen dem dekadischen Logarythmus der Konzentration und dem Hemmhofdurchmesser ein Verhältnis, das sich mit der Funktion y=ax + b ausdrücken läßt (Krasemann 1978, Wiedemann 1978, Krasemann 198o).

Mittels einer Regressionsanalyse kann man aus den ausgemessenen Hemmhofdurchmessern, die in Millimetern angegeben werden, die Konzentration des entsprechenden Antibiotikums errechnen (Grimm 1978).

Auch wenn alle einflußnehmenden Variablen Beachtung finden, beträgt die Fehlerabweichung etwa ± 1o% (Erlansson 1951, Krasemann 198o). Versuche, bei denen dieser Fehler von ± 1o% überschritten wurde, fanden bei der Auswertung keine Berücksichtigung.

Alle Labormaßnahmen und Versuchsvorbereitungen wurden von derselben Person ausgeführt, sodaß der Einfluß von Störfaktoren so gering als möglich gehalten werden konnte (Humphrey 1952, Simpson 1963, Ericsson 1971).

Die Konzentration der Proben wurde aus den mit der Schublehre ermittelten Werten der Hemmhofdurchmesser für jede Platte gesondert ermittelt (Knothe 198o (b)).

Platten mit einer nur mäßigen Korrelation, also Korrelationskoeffizienten von weniger als -o,9, fanden keine Berücksichtigung.

3.1o. Herstellen der Agarplatten

Gemäß der Vorschrift des Herstellers wurden 38 g der Trockensubstanz des Mueller-Hinton-Agars mit 1ooo ml destilliertem Wasser versetzt und anschließend für 3o Minuten autoklaviert. Danach erfolgte die Abkühlung im Wasserbad auf 5o° C. Zuvor mehrfach sterilisierte quadratische (22 x 22 cm) Platten aus hitzebeständigem Kristallglas wurden mit Plexiglasringen belegt, welche zuvor mehrfach heiß gespült und in 7o-prozentigem Propylalkohol desinfiziert worden waren. Verunreinigungen wurden so weitestgehend vermieden. Die Platten wurden auf einem waagerecht ausgerichteten Tisch gelagert und unmittelbar vor dem Auftragen des Agars mit dem Bunsenbrenner abgeflammt (Simpson 1963, Wiedemann 1978).

In Vorversuchen wurde die optimale Keimkonzentration ermittelt, bei der sich ein möglichst dichter, gleichmäßiger Bakterienrasen ausbildete, jedoch die einzelnen Bakterienkolonien, wie von Ericson und Sherris beschrieben, noch voneinander abgrenzbar waren (Ericson 1971, Wiedemann 1978, Knothe 198o (b)).

Diese optimale Konzentration belief sich auf 2,5 ml Escherichia coli-Suspension auf 1oo ml Agar und wurde bei jedem Versuch streng beibehalten. Auf jede Platte wurden dann 5o ml dieses Bakterienagars gebracht, und zwar bei jedem Versuch konstant, da die Schichtdicke erheblichen Einfluß auf die Hemmhofgröße hat (DIN 5894o 1976, Wiedemann 1978). Luftblasen, die beim Gießen aufgetreten waren, wurden durch kurzes Überstreichen mit dem Bunsenbrenner beseitigt, sodaß eine glatte Agarfläche resultierte (Simpson 1963).

Nachdem der Agar erkaltet war, wurde unter die Glasplatten eine Schablone gelegt und mit einem, eigens zu diesem Zwecke angefertigten, aus Edelstahl bestehenden an-

geschliffenen Hohlrohr entsprechend viele Löcher in die Agarfläche gestanzt, je nachdem, wieviele Stellen der entsprechende Versuch erforderte. Im Höchstfall konnten bei 2o cm Platteninnendurchmesser und erwarteten größtmöglichen einzelnen Hemmhofdurchmessern von etwa 35 mm und einigen Millimetern Sicherheitsabstand zwischen den Hemmhöfen 14 Auftragsstellen pro Platte untergebracht werden. Es waren aber in der Regel 1o - 12 Stellen ausreichend.

Die derart präparierten Platten wurden entweder unverzüglich weiterverarbeitet oder kurzzeitig bei 4^{o} C gelagert. In jedes der ausgestanzten Löcher wurden mit der Pipette 1oo µl Proben- oder Standardlösung gebracht. Das Auftragen der Substanzen in die Löcher erfolgte in randomisierter Verteilung (Simpson 1963). Die Platten wurden mit Filterpapier abgedeckt um das Abtropfen von Kondenswasser zu verhindern, gestapelt und im Brutschrank 16 - 2o Stunden bebrütet und anschließend ausgewertet.

Aus Gründen der Präzision wurde streng darauf geachtet, alle Proben und Standardkonzentrationen eines Versuches auf einer Agarplatte aufzutragen. Eine ausreichende Zahl von Meßwerten wurde durch zusätzliches Auftragen der gleichen Proben mit ihren Standardwerten auf drei weitere Platten erreicht.

3.11. Eichkurven

Sowohl von Cefotaxim, als auch von seinem Desacetylmetaboliten, wurden Eichkurven angefertigt.

Dazu wurden unter Berücksichtigung der Molarität und der Wertigkeit des Cefotaxims und des Desacetylcefotaxims entsprechende Mengen abgewogen und mit Pufferlösung verdünnt, um so äquimolare Lösungen zu erhalten.

Die beiden Stammlösungen enthielten 1o µg/ml Wirksubstanz und wurden zu Konzentrationsstufen von o.1; o.2; 1,o; 2,o; 2,5; 3,o und 4,o µg/ml mit Pufferlösung verdünnt, wobei auf die Konzentrationsstufe von o,1 µg/ml verzichtet werden mußte, da der sich ausbildende Hemmhof zum genauen Ausmessen zu klein war.

Die entsprechenden Konzentrationsstufen von Cefotaxim und Desacetylcefotaxim wurden gemeinsam auf jeweils eine Platte aufgetragen, um für beide Verbindungen die gleichen Voraussetzungen zu schaffen. Es fanden 8 Platten mit je 14 Stellen Verwendung - da insgesamt 16 Stellen pro Platte benötigt wurden, mußte auf jeder Platte alternierend auf ein Wertepaar verzichtet werden, sodaß jede Konzentrationsstufe 7 mal auf unterschiedlichen Platten in randomisierter Verteilung aufgetragen wurde. Aus den Ergebnissen wurde das arythmetische Mittel errechnet und die Kurven erstellt.

3.12. Standardkonzentrationen

Nach Aufstellungen der Eichkurven wurden für alle Versuche die Standardlösungen mit den Cefotaxim-Konzentrationsstufen von o,5 µg/ml, 1,o µg/ml, 2,o µg/ml und 5,o µg/ml angesetzt.

Dazu wurden o,o1 g Cefotaxim-Natrium-Trockensubstanz abgewogen und dann entsprechend der Wertigkeit des Cefotaximstandards mit 9,35 ml Proben- bzw. Pufferlösung versetzt. Diese Stammlösung von 1ooo µg Cefotaxim/ml diente als Ausgangspunkt für alle weiteren Standardverdünnungsstufen. Die Stammlösung und die Standardlösungen wurden in der Regel jeweils mit dem betreffenden Probenmedium angesetzt. War dieses Vorgehen aber aus technischen Gründen nicht möglich, wurde Pufferlösung verwendet (Beispiel: Versuch mit Muskulatur).

3.13. Proben

Allen Testsubstanzen ist eine Cefotaximkonzentration von 1o µg/ml gemeinsam, die aus der Stammlösung gemäß der Aufgabenstellung hergestellt wurde. Die Verdünnung erfolgte je nach Versuch mit Pufferlösung oder Testmedium aus der jeweiligen Stammlösung von 1ooo µg/ml.

Vorversuche hatten ergeben, daß bei dieser Methode des Agardiffusionstests die Hemmhöfe bei einer Cefotaximkonzentration von 1o µg/ml nicht mehr linear wachsen - bei Konzentrationen kleiner 5 µg/ml dagegen ergibt die graphische Darstellung des Hemmhofdurchmessers gegen den Logarythmus der Konzentration eine Gerade.

Aus diesem Grunde wurde zum Auftragen der Proben eine weitere Verdünnung auf 2,5 µg Cefotaxim pro ml gewählt und der wiedergefundene Wert der Konzentration mit dem Faktor 4 multipliziert. Da im Idealfalle kein Abfall der Cefotaximkonzentration erwartet wurde, lag dieser Wert von 2,5 µg Cefotaxim pro ml innerhalb der gewählten Standardbreite von o,5 µg/ml bis 5,o µg/ml.

Eine Hälfte der Probe, 2,5 µg Cefotaxim pro ml enthaltend, wurde sofort und gemeinsam mit den zugehörigen Standardlösungen auf die vorbereiteten Agarplatten aufgetragen. Die Platten wurden für 16 bis 2o Stunden bei 37° C bebrütet und anschließend ausgewertet. Die andere Probenhälfte wurde bei -2o° C über sieben Tage tiefgefroren und nach Ablauf dieser Zeit gegen frisch hergestellte Standardlösung aufgetragen und ebenso 16 bis 2o Stunden bebrütet und ausgewertet. Die hierbei verwendete, frisch angesetzte Standardlösung entsprach hinsichtlich Herstellung und Zusammensetzung derjenigen Standardlösung, die bei dem unmittelbar verarbeiteten Probenteil Verwendung fand.

Da die Proben von Personen stammten, die in der Zeit vor

der Abgabe möglicherweise antibiotisch behandelt worden waren, wurde jede Probe im unverarbeiteten Zustand auf der Agarplatte hinsichtlich eventuell vorhandener antibiotischer Eigenaktivität getestet.

3.14. Auswertung

Bei Kontrolle der bebrüteten Platten zeigte sich regelmäßig ein doppelter Hemmhof, derart, daß ein größerer, scharf abgegrenzter Bezirk von einem schmaleren, weniger deutlich abgegrenzten Bezirk umgeben war. Dieses Phänomen ist anscheinend als Eigenart des verwendeten Bakterienstammes anzusehen. Da der innere Hemmhof besser abgrenzbar war und hier ein deutlich reduziertes Wachstum der Bakterien zu erkennen war, wurde dieser zur Ausmessung des Durchmessers verwendet (Wiedemann 1978).

Das Ausmessen erfolgte von der Rückseite durch die Glasplatte vor dunklem Hintergrund mittels einer Schublehre auf o,1 mm genau. Zur Auswertung kamen ausschließlich zirkuläre Hemmhöfe; auf die Auswertung verunreinigter Platten wurde verzichtet (Humphrey 1952).

Aus mehreren gleichzeitig durchgeführten Kontrollversuchen wurde das arythmetische Mittel der Hemmhofdurchmesser ermittelt und als Ergebnis aufgezeichnet.

Der Einfluß störender Faktoren wurde gering gehalten - Testorganismus, Kulturmedium, Bebrütungszeit und Bebrütungstemperatur waren bei jedem Versuch konstant (Knothe 198o (b)).

4. Ergebnisse

4.1. Eichkurven

Die Eichkurven (s. Abbildung 2) dienten zum Nachweis der postulierten Linearität der Funktion zwischen dem dekadischen Logarythmus der verschiedenen Konzentrationen und den ermittelten Hemmhofdurchmessern, außerdem wurde anhand der Eichkurven entschieden, welche Konzentrationsstufen für die Standardwerte gewählt werden mußten.

Die Standardabweichung wurde nicht in Abbildung 2 eingezeichnet, sie kann als maximale Streuwerte (s_{max}) aus Tabelle 1 entnommen werden. Beide Eichkurven verlaufen linear, der Korrelationskoeffizient liegt jeweils bei o,99.. .

Mit den Eichkurven von Cefotaxim und Desacetylcefotaxim wurde auch der Nachweis geführt, daß der Desacetylmetabolit in vitro eine geringere antibiotische Aktivität aufweist als Cefotaxim selbst.

Substanz	lineare Regression f(x)	r	s_{max}(mm)
Cefotaxim	y=6,6 log1ox + 23,2	o,99o3	± o,83
Desacetyl-Cefotaxim	y=9,5 log1ox + 14,4	o,9882	± o,83

Tabelle 1: Eichkurven, lineare Funktionen
(r ist der Korrelationskoeffizient für die zugehörige Funktion, s_{max} ist die größtmögliche Standardabweichung der jeweiligen Eichkurve.)

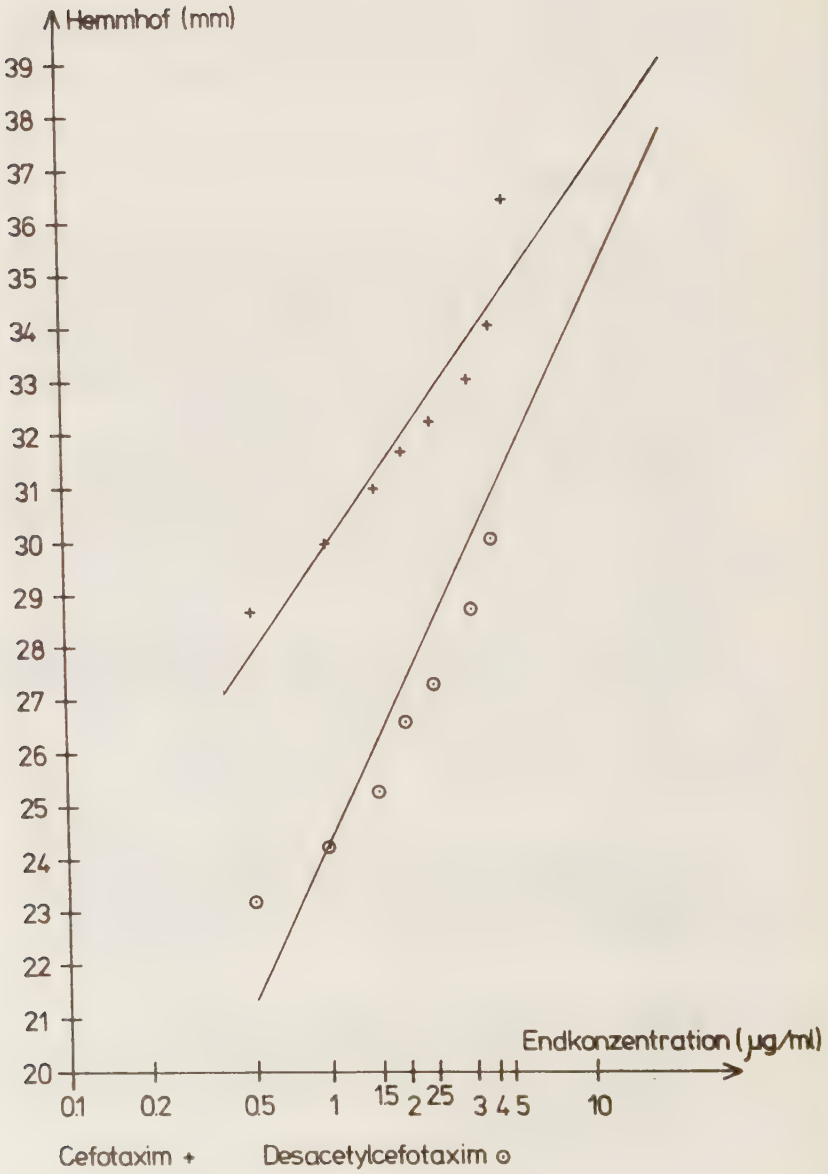

Abbildung 2: Eichkurven für Cefotaxim und Desacetylcefotaxim beim Agardiffusionstest mit Escherichia coli Typ 63-11/65

4.2. Speichel

Dem Sammelspeichel wurden 1o µg Cefotaxim pro ml zugesetzt. Diese Probe wurde geteilt und eine Hälfte sofort, die andere nach 7 Tagen Frost entsprechend verarbeitet.

Die Wiedergewinnungsrate betrug beim Speichel (Angaben in µg/ml):

9,85 (Bereich 9,69 - 1o,1) unmittelbar
(r=o,9997; s=±o,17)
9,87 (Bereich 8,94 - 1o,51) nach 7 Tagen Frost
(r=o,9986; s=±o,77)

Es wurden 4 Versuche an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichem Material durchgeführt.

4.3. Serum

Dem Serum wurden 1o µg Cefotaxim pro ml zugesetzt, die Probe geteilt und eine Hälfte sofort, die andere nach 7 Tagen Frost entsprechend verarbeitet.

Die Wiedergewinnungsrate betrug beim Serum (Angaben in µg/ml):

9,53 (Bereich 9,31 - 1o.41) unmittelbar
(r=o,9992; s=±o,48)
1o,19 (Bereich 9,93 - 1o,63) nach 7 Tagen Frost
(r=o,9997; s=±o,31)

Es wurden 4 Versuche an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichem Material durchgeführt.

4.4. Plasma

Dem Plasma wurde Cefotaxim (1o µg/ml) zugesetzt, die Probe geteilt und eine Hälfte sofort, die andere nach 7 Tagen Frost entsprechend verarbeitet.

Die Wiedergewinnungsrate betrug beim Plasma (Angaben in µg/ml):

9,55 (Bereich 9,14 - 9,68) unmittelbar
(r=o,9847; s=±o,27)
1o,o9 (Bereich 9,68 - 1o,33) nach 7 Tagen Frost
(r=o,9959; s=±o,27)

Es wurden 4 Versuche an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichem Material durchgeführt.

4.5. Urin

Den einzelnen Urinproben wurde Cefotaxim (1o µg/ml) zugesetzt. Die Proben wurden geteilt und je eine Hälfte sofort, die andere nach 7tägiger Lagerung bei -2o° C entsprechend verarbeitet.

Die Wiedergewinnungsraten sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Es wurden 4 Versuche an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichem Material für jede der 5 pH-Stufen durchgeführt.

4.6. Galle

Der Gallenflüssigkeit wurde 1o µg Cefotaxim pro ml zugesetzt, die Probe geteilt und eine Hälfte sofort, die andere nach 7 Tagen Frostinkubation entsprechend verarbeitet.

		Rückgewinnung in µg/ml	
		unmittelbar	nach 7 Tagen Lagerung bei -20°C
pH-Wert	6.0	10.41 (Bereich 9.99 - 10.9) (r=0.9985 ;s= ± 0.4 µg/ml)	10.08 (Bereich 9.61 - 10.57) (r=0.9991 ;s= ± 0.47µg/ml)
	6.5	10.2 (Bereich 9.61 - 10.53) (r=0.9962 ;s= ± 0.39µg/ml)	9.69 (Bereich 9.06 - 10.67) (r=0.9991 ;s= ± 0.77µg/ml)
	7.0	9.99 (Bereich 9.6 - 10.38) (r=0.9999 ;s= ± 0.35µg/ml)	9.77 (Bereich 9.05 - 10.27) (r=0.9995 ;s= ± 0.52µg/ml)
	7.5	10.43 (Bereich 9.75 - 10.85) (r=0.9944 ;s= ± 0.5 µg/ml)	9.99 (Bereich 9.04 - 10.7) (r=0.9996 ;s= ± 0.76µg/ml)
	8.0	9.89 (Bereich 8.8 - 10.94) (r=0.9992 ;s= ± 1.15µg /ml)	9.31 (Bereich 8.83 - 9.99) (r=0.9984 ;s= ± 0.52µg/ml)

Tabelle 2: Rückgewinnung bei Urin

Die Wiedergewinnungsrate bei den Versuchen mit Gallenflüssigkeit betrug (Angaben in µg/ml):

9.83 (Bereich 9,66 - 1o,19) unmittelbar
(r=o,9997; s=±o,25)
9,6 (Bereich 9,13 - 1o,o) nach 7 Tagen Frost
(r=o,9987; s=±o,46)

Es wurden 4 Versuche an verschiedenen Tagen mit unterschiedlichem Material durchgeführt.

4.7. Muskulatur

Die Aufarbeitung der Muskulaturproben erfolgte wie oben beschrieben. In Anbetracht der großen Verschiedenheit der Proben werden die Versuche mit Muskulatur nachfolgend einzeln dargestellt. Es wurden an verschiedenen Tagen 7 Versuche mit Proben unterschiedlicher Herkunft durchgeführt.

In Tabelle 3 ist der Wirkungsverlust des Cefotaxims (in % der eingesetzten Konzentration) zusammengefaßt.

Wiedergewinnung des Cefotaxims (Angaben in µg/ml):

Leiche Nr.1, männlich, 5ojährig, Herzinfarkt
9,41 (Bereich 9,o1 - 9,78) unmittelbar
(r=o,9975; s=±o,33)
4,o8 (Bereich 3,81 - 4,5) nach 7 Tagen Lagerungsdauer
(r=o,9917; s=±o,3o) bei -2o° C

Leiche Nr.2, männlich, 54jährig, Suizid (Strangulation)
9,18 (Bereich 8,87 - 9,73) unmittelbar
(r=o,9983; s=±o,51)
1,76 (Bereich 1,74 - 1,82) nach 7 Tagen Lagerungsdauer
(r=o,9998; s=±o,o5) bei -2o° C

Leiche Nr.3, männlich, 51jährig, Suizid (Strangulation)
9,1o (Bereich 8,64 - 9,54) unmittelbar
(r=o,9961; s=±o,45)
1,o (Bereich o,93 - 1,o6) nach 7 Tagen Lagerung bei -2o°C
(r=o,9995; s=±o,o6)

Leiche Nr.4, weiblich, 21jährig, Suizid (Strangulation)
9,48 (Bereich 9,19 - 1o,59) unmittelbar
(r=o,9983; s=±o,99)
o,88 (Bereich o,78 - 1,o9) nach 7 Tagen Lagerung bei
(r=o,9969; s=±o,18) -2o° C

Leiche Nr.5, männlich, 71jährig, Herzinfarkt
9,4o (Bereich 8,89 - 1o,2) unmittelbar
(r=o,9962; s=±o,7)
o,89 (Bereich o,84 - o,93) nach 7 Tagen Lagerung bei
(r=o,9948; s=±o,o5) -2o° C

Leiche Nr. , weiblich, 45jährig, Suizid (Strangulation)
9,39 (Bereich 9,22 - 9,49) unmittelbar
(r=o,98[illegible]2; s=±o,14)
7,32 (Bereich 7,18 - 7,52) nach 7 Tagen Lagerung bei
(r=o,9852; s=±o,14) -2o° C

Leiche Nr.7, männlich, 4ojährig, Suizid (Strangulation)
9,35 (Bereich 8,63 - 1o,48) unmittelbar
(r=o,9937; s=±o,84)
4,4 (Bereich 3,68 - 5,1) nach 7 Tagen Lagerung bei
(r=o,9992; s=±o,6) -2o° C

Muskelprobe	1	2	3	4	5	6	7
Wirkungsverlust (%)	56,5	81,o	89,o	91,o	9o,5	22,o	43,5

Tabelle 3: Wirkungsverlust des Cefotaxims in Muskulatur nach einer Lagerungsdauer von 7 Tagen bei -2o° C (abgerundete Werte).

4.8. Erythrozyten

Die Ergebnisse der Versuche mit gewaschenen Erythrozytenkonzentraten unterschiedlicher Konzentrationsstufen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Für jede der 1o Konzentrationsstufen wurden 4 Versuche an unterschiedlichen Tagen mit jeweils frischen Blutkonserven durchgeführt.

In Tabelle 5 sind Verdünnungsstufen, Erythrozytenkonzentrationen und Wirkungsverlust des Cefotaxims in % der eingesetzten Konzentration nach 7tägiger Lagerung bei -2o° C gegenübergestellt.

Verdünnung	Standard	Rückgewinnung (µg/ml) unmittelbar	Rückgewinnung (µg/ml) nach 7 Tagen Lagerung bei -20°C
1 : 2	gew. Erythrozytenkonz.	9.26 (Bereich 9.2 - 9.36) (r = 0.9920; s = ± 0.08 µg/ml)	0.14 (Bereich 0.07 - 0.19) (r = 0.9940; s = ± 0.06 µg/ml)
1 : 4	Pufferlösung	9.58 (Bereich 9.19 - 10.5) (r = 0.9963; s = ± 0.35 µg/ml)	1.1 (Bereich 1.03 - 1.21) (r = 0.9948; s = ± 0.09 µg/ml)
	gew. Erythrozytenkonz.	9.67 (Bereich 9.2 - 10.33) (r = 0.9998; s = ± 0.47 µg ml)	1.19 (Bereich 1.14 - 1.21) (r = 0.9945; s = ± 0.04 µg ml)
1 : 10	Pufferlösung	9.6 (Bereich 9.02 - 10.24) (r = 0.9971; s = ± 0.52 µg/ml)	2.05 (Bereich 1.83 - 2.28) (r = 0.9959; s = ± 0.32 µg/ml)
	gew. Erythrozytenkonz.	9.65 (Bereich 9.08 - 10.82) (r = 0.9969; s = ± 0.79 µg/ml)	1.79 (Bereich 1.62 - 1.96) (r = 0.9977; s = ± 0.24 µg/ml)

Tabelle 4(a): Rückgewinnung von Cefotaxim aus verschiedenen Konzentrationsstufen von gewaschenen Erythrozyten

Verdünnung	Standard	Rückgewinnung (µg/ml) unmittelbar	Rückgewinnung (µg/ml) nach 7 Tagen Lagerung bei -20°C
1 : 20	Pufferlösung	10.23 (Bereich 9.96 - 10.55) (r = 0.9981 ; s = ± 0.25 µg/ml)	2.19 (Bereich 2.13 - 2.26) (r = 0.9948 ; s = ± 0.09 µg/ml)
	gew. Erythrozytenkonz.	10.25 (Bereich 9.23 - 10.99) (r = 0.9993 ; s = ± 0.75 µg/ml)	2.19 (Bereich 2.13 - 2.25) (r = 0.9965 ; s = ± 0.08 µg/ml)
1 : 40	Pufferlösung	10.68 (Bereich 10.39 - 10.94) (r = 0.9921 ; s = ± 0.30 µg/ml)	3.73 (Bereich 3.64 - 3.82) (r = 0.9991 ; s = ± 0.09 µg/ml)
	gew. Erythrozytenkonz.	10.8 (Bereich 10.52 - 11.04) (r = 0.9910 ; s = ± 0.21 µg/ml)	3.6 (Bereich 3.14 - 3.93) (r = 0.9966 ; s = ± 0.41 µg/ml)
1 : 10^2	gew. Erythrozytenkonz.	9.95 (Bereich 9.82 - 10.08) (r = 0.9994 ; s = ± 0.18 µg/ml)	6.25 (Bereich 5.65 - 7.1) (r = 0.9990 ; s = ± 0.75 µg/ml)

Tabelle 4(b): Rückgewinnung von Cefotaxim aus verschiedenen Konzentrationsstufen von gewaschenen Erythrozyten

Verdünnung	Standard	Rückgewinnung (µg/ml) unmittelbar	Rückgewinnung (µg/ml) nach 7 Tagen Lagerung bei -20°C
$1 : 10^3$	gew. Erythrozytenkonz.	9.45 (Bereich 9.35 - 9.5) (r = 0.9981 ; s = ± 0.12 µg/ml)	7.2 (Bereich 7.05 - 7.32) (r = 0.9980; s = ± 0.13 µg/ml)
$1 : 10^4$	gew. Erythrozytenkonz.	9.71 (Bereich 9.67 - 9.76) (r = 0.9969 ; s = ± 0.06 µg /ml)	6.85 (Bereich 6.4 - 7.1) (r = 0.9955; s = ± 0.38 µg/ml)
$1 : 10^5$	gew. Erythrozytenkonz.	9.27 (Bereich 9.07 - 9.64) (r = 0.9983 ; s = ± 0.32 µg /ml)	9.06 (Bereich 8.82 - 9.29) (r = 0.9955; s = ± 0.2 µg /ml)
$1 : 10^6$	gew. Erythrozytenkonz.	9.87 (Bereich 9.86 - 9.87) (r = 0.9998 ; s = ± 0.01 µg /ml)	9.15 (Bereich 8.89 - 9.39) (r = 0.9988 ; s = ± 0.25 µg/ml)

Tabelle 4(c): Rückgewinnung von Cefotaxim aus verschiedenen Konzentrationsstufen von gewaschenen Erythrozyten

Verdünnungs-stufe	Erythrozytenkonzentration (Erythrozyten/ml)	Wirkungsverlust (%)
1 : 2	$3.0\text{-}4.0 \times 10^9$	98.5
1 : 4	$1.5\text{-}2.0 \times 10^9$	88.0
1 : 10	$6.0\text{-}8.0 \times 10^8$	82.5
1 : 20	$3.0\text{-}4.0 \times 10^8$	78.5
1 : 40	$1.5\text{-}2.0 \times 10^8$	66.5
$1 : 10^2$	$6.0\text{-}8.0 \times 10^7$	37.0
$1 : 10^3$	$6.0\text{-}8.0 \times 10^6$	24.0
$1 : 10^4$	$6.0\text{-}8.0 \times 10^5$	29.5
$1 : 10^5$	$6.0\text{-}8.0 \times 10^4$	kein sicherer Abfall
$1 : 10^6$	$6.0\text{-}8.0 \times 10^3$	kein sicherer Abfall

Konzentration in vivo

Tabelle 5: Wirkungsverlust von Cefotaxim in verschiedenen Konzentrationsstufen einer Suspension gewaschener Erythrozyten nach 7 Tagen Lagerung bei -20° C (abgerundete Werte)

5. Diskussion

Die Stabilität eines Antibiotikums ist in vivo Voraussetzung für eine therapeutisch ausreichende Konzentration, in vitro gewinnt sie wesentliche Bedeutung bei der Kontrolle der Gewebe- und Serumspiegel. Entscheidend ist die Kenntnis über die Bedingungen und das Ausmaß eines möglichen Aktivitätsverlustes.

Hinweise auf eine metabolische Unwandlung von Cephalosporinen fanden sich bereits unmittelbar nach der Entwicklung des ersten Cephalosporins, dem Cephalosporin C und seinem ersten Folgeprodukt, der 7 Phenylacetamidocephalosporansäure, bzw. deren Natriumsalz (O'Callaghan 1963).

Bei Cephalosporinen im Allgemeinen ergeben sich aufgrund der Molekülstruktur folgende Angriffspunkte für eine mögliche Inaktivierung durch Enzyme:

1. Hydrolyse an der C7-Seitenkette (Aminoacylgruppe) durch Acylasen bakterieller Herkunft (Sjöberg 1967, Cole 1969 (a+b)).
2. An der C3-Seitenkette gegebenenfalls eine Desacetylierung (Acetoxymethylgruppe) durch Acetylesterasen aus Mikroorganismen und verschiedenen Säugetiergeweben (O'Callaghan 1963, Barman 1969, O'Callaghan 1979, Chamberlain 198o).
3. Hydrolyse des β-Lactamringes durch bakterielle β-Lactamasen (Wise 1978, Labia 198o, Mitsuhashi 198o, Richmond 198o, Schrinner 198o).

Cefotaxim selbst ist hochgradig β-lactamase-stabil (Labia 198o, Mitsuhashi 198o, Richmond 198o, Schrinner 198o). Dafür verantwortlich ist der C7-Substituent, der in der sogenannten "Syn"-Form vorliegt. Die sogenannte "Anti"-Form zeigt nur eine geringe mikrobiologische Aktivität (Bucourt 198o) (s. Abbildung 1).

Bei den Cephalosporinen kann durch Hydrolyse die α-Aminoadipoyl-Gruppe in der Position 7 vom Kern getrennt werden. Es entstehen somit Metaboliten, welche ebenfalls eine antibiotische Aktivität aufweisen, allerdings nur in der Höhe von etwa 2o% der Ausgangsprodukte (Hydroxylsäure-Metaboliten bei intaktem β-Lactamring).

Als Hauptentstehungsorte dieser Metaboliten erwiesen sich Leber, Nieren und Milz (O'Callaghan 1963).

Für Cefotaxim lagen bereits frühzeitig Hinweise für das Auftreten eines Desacetylmetaboliten vor (Wise 1878). Bei seinem Strukturverwandten, dem Cephalothin, wurde erstmals der Zusammenhang zwischen der Acetoxyestergruppe in der Position 3 des Cephemringes und dem Auftreten des Desacetylmetaboliten, Desacetyl-Cephalothin, beschrieben (Sullivan 1971, Cooper 1973, O'Callaghan 1979). Desacetyl-Cefotaxim zeigt jedoch im Gegensatz zu Desacetyl-Cephalothin eine therapeutisch nutzbare antimikrobielle Aktivität (O'Callaghan 1979, Knothe 198o (a), Reeves 198o, Schrinner 198o, Wise 198o (b)).

In der jüngsten Zeit konnten nähere Aufschlüsse über die Metabolisierung von Cefotaxim gewonnen werden (Chamberlain 198o, Neu 198o, Reeves 198o, Wise 198o (b)).

In Analogie zu den anderen Cephalosporinen mit einer 3 Acetoxymethyl-Seitenkette beginnt der Abbau mit einer Desacetylierung. Cefotaxim wird in vivo zu 6o% unverändert über die Nieren ausgeschieden, von den verbleibenden 4o% werden 15 bis 2o% zum Desacetylmetaboliten degradiert (Fu 1979, Esmieu 198o, Neu 198o, Schrinner 198o, Wise 198o (a+b)).

Für diese Umwandlung zum Desacetyl-Cefotaxim werden hauptsächlich Leberesterasen verantwortlich gemacht (Chamberlain 198o).

Die weitere Metabolisierung erfolgt, vermutlich ebenfalls in der Hauptsache enzymatisch, zum Desacetyl-Cefo-

taxim-Lacton und weiteren Metaboliten, die UP 1 und UP 2 genannt werden (UP:unknown peaks) und einen, durch (bakterielle?) Hydrolyse zerstörten β-Lactamring aufweisen (Wise 1978, Chamberlain 198o, Reeves 198o, Wise 198o (b)). (s. Abbildung 3).

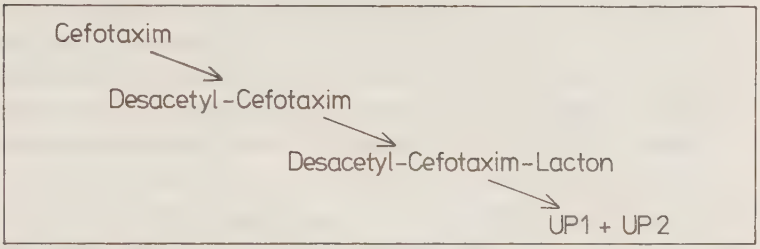

Abbildung 3: Überblick über den biochemischen Abbau von Cefotaxim

In unseren Untersuchungen konnte beim Cefotaxim nach Inkubation in Gewebehomogenaten von Leber und Nieren und in Acetylesterase ein Wirkungsverlust von über 5o% festgestellt werden (Zeh 1981).

Diese Metabolisierung der 3-Acetoxymethyl-Cephalosporine durch die Esterasen verschiedener Säugetierspezies wurde für diese Antibiotikaklasse besonders bei Inkubation mit haemolytischem Blut nachgewiesen (Wright 198o). Für Cefotaxim selbst fand man eine schnelle Degradierung zu Desacetyl-Cefotaxim in Haemolyseblut, während in frischem Vollblut keine Desacetylierung nachgewiesen werden konnte. ^{14}C-markiertes Cefotaxim war in normalem Vollblut stabil und der Anteil des Desacetyl-Cefotaxims war gering. Nach 3ominütiger Inkubation in haemolytischem Blut zeigte sich dann eine merkliche Umwandlung zu Desacetyl-Cefotaxim. Nach Ablauf von 2 Stunden betrug der Anteil des Desacetyl-Metaboliten über 8o% der eingangs zugegebenen radioaktiv markierten Antibiotikumkonzentration (Chamberlain 198o, Wise 198o (a)).

Desacetylierung in Haemolyseblut wurde bei den 3-Acetoxymethyl-Cefalosporinen für Cefotaxim, Cephalothin, Cephapirin und Cephacetril nachgewiesen (Wright 198o).

Wenn also aus unterschiedlichen Ursachen rote Blutzellen zerstört werden, kommt es zur Freisetzung der Acetylesterasen und nachfolgendem Abbau des Antibiotikums. Werden Cefotaxim-enthaltende Proben tiefgefroren, so kommt es nach Traumatisierung der Zellmembranen zum Enzymaustritt und zur Degradierung.

In menschlichem Serum und Plasma dagegen konnte nach Gefrieren und Auftauen kein Konzentrationsabfall festgestellt werden (Wiedergewinnung 1oo%). Auch im Speichel verhalten sich die Cefotaximkonzentrationen nach Gefrierung, Lagerung bei -2o° C und Auftauen stabil (Wiedergewinnung 1oo%). Nach den vorliegenden Angaben in der Literatur finden sich in vivo im Speichel keine ausreichenden Cefotaximkonzentrationen (Kosmidis 198o, Morel 198o), im Gegensatz zu Bronchialsekret (Jenkinson 198o, Neu 198o). Cefotaxim erscheint nach parenteraler Applikation nur in relativ geringer Konzentration in der Gallenflüssigkeit (o.o1 bis o,1%) (Hamilton-Miller 1978, Kosmidis 198o, Neu 198o, Soussy 198o). Die Aktivität in den intrahepatischen Gallenwegen ist vergleichsweise höher (Chamberlain 198o). In Galle (pH 6,5 bis 6,6) konnte kein Konzentrationsverlust nach Auftauen der gefrorenen Proben nachgewiesen werden, die Wiedergewinnung lag bei 1oo%. Cefotaxim weist in vivo hohe Urinkonzentrationsspiegel auf (Drasar 1978, Hamilton-Miller 1978, Fu 1979, Casellas 198o, Chamberlain 198o, Kosmidis 198o, Neu 198o, Newsom 198o, Schrinner 198o, Young 198o). Gefrieren und Auftauen eines Urins, der auf die pH-Stufen 6,o bis 8,o eingestellt war, hatte keinen Einfluß auf die Cefotaximkonzentration im Urin.

In den genannten Proben (Serum, Plasma, Speichel, Galle und Urin) fand sich also, vorausgesetzt, daß bestimmte

Parameter beachtet wurden (z.B. pH-Stabilität), unter den gewählten Versuchsbedingungen kein Abfall der biologischen Aktivität des eingesetzten Cefotaxims.

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Versuchen mit Muskelgewebe erhebliche Stabilitätsprobleme. So betrug der Wirkungsverlust beim Cefotaxim nach Inkubation im Muskelhomogenat und Frosteinwirkung je nach Versuch zwischen 22 und 91%. Dieser ausgeprägt hohe Aktivitätsabfall kann durch die mit der Gewebeaufarbeitung verbundene mechanische Zellalteration und der Freisetzung hydrolytischer Enzyme - besonders der Gewebeesterasen - erklärt werden, die, wie bereits erwähnt, die Metabolisierung durch Angriff an der C3-Seitenkette einleiten. Ein weiterer inaktivierender Faktor ist in dem Restblutanteil der Gewebehomogenate zu sehen. In den 5o%igen Gewebehomogenaten wird der Restblutanteil mit weniger als 1o% (Gew./Gew.) als relativ gering bezeichnet (Tiesler 1976, Plaue 1978, Plaue 1979). Trotzdem darf, auch bei der Anwesenheit geringster Erythrozytenkonzentrationen, die Stabilität des Cefotaxims nach Gefrieren und Auftauen nicht überschätzt werden, wie die sehr niedrigen Wiedergewinnungsraten des Cefotaxims in Suspensionen von gewaschenen Erythrozyten zeigen. Es wurden unterschiedliche Erythrozytenkonzentrationen, etwa beginnend mit der physiologischen Konzentration im Blut ($4,o \times 1o^9$ Zellen/ml) bis zu sehr niedrigen Konzentrationen ($8,o \times 1o^3$ Zellen/ml) gewählt. Parallel steigendem Verdünnungsverhältnis erhöhte sich auch die Wiedergewinnungsquote. Der Wirkungsverlust betrug bei der physiologischen Erythrozytenkonzentration bis zu 98,5% und erreichte bei einer Verdünnung von $1:1o^4$ (Erythrozytenkonzentration $6,o - 8,o \times 1o^5$ Zellen/ml) immerhin noch etwa 3o%. Bei noch stärkerer Verdünnung konnte kein sicherer Konzentrationsabfall mehr nachgewiesen werden.

Für die Konzentrationsbestimmung von Cefotaxim in Körperflüssigkeiten und im Gewebe ergeben sich wichtige Folgerungen. Membran- bzw. Zellzerstörungen während der Entnahme,

des Transportes, der Lagerung oder der Aufarbeitung der Proben können zur Freisetzung und Einwirkung degradierender Enzyme führen, die in vivo dem Cefotaxim nicht zugänglich sind. In diesen Fällen sind dann die mittels mikrobiologischer Methoden erfolgten Konzentrationsbestimmungen zu niedrig. Mit Fehlbestimmungen ist vor allem bei Proben mit größerem Erythrozytengehalt zu rechnen, aber durchaus auch bei Serum- und Plasmaproben, die aus (teil-)haemolytischem Blut gewonnen wurden.

6. Zusammenfassung

Cefotaxim wurde in einer Konzentration von 1o mg/l frisch gewonnenen Proben (Serum, Plasma, Speichel, Galle, Urin, homogenisierte Muskulatur und gewaschene Erythrozyten des Menschen) zugegeben. Die Aktivität wurde in einer Probenhälfte unmittelbar, in der anderen 7 Tage später nach Aufbewahrung bei Tiefkühlung (-2o° C) bestimmt.

Die biologische Aktivität des Cefotaxims wurde in Serum, Plasma, Speichel, Galle (gepuffert) und Urin (pH 6,o bis 8,o) durch Tiefgefrieren, Lagern und Auftauen nicht beeinflußt. Bei den Homogenaten aus Muskelgewebe wurde eine Aktivitätsminderung um 22,o bis 91,o% beobachtet. In Suspensionen gewaschener Erythrozyten unterschiedlicher Konzentrationsstufen (3,o x $1o^9$ Zellen/ml bis 6,o x $1o^3$ Zellen/ml) konnte ein Aktivitätsverlust von 24,o bis 98,o% gezeigt werden.

Ein nicht kontrollierter Aktivitätsverlust des Cefotaxims bei Gewinnung, Lagerung und Verarbeitung der Proben kann für niedrige Konzentrationsangaben in der Literatur verantwortlich sein.

7. Literaturverzeichnis

Barman, T.E. : Enzyme Handbook. Volume II. Springer. Berlin, New York, Heidelberg 1969. S. 507

Bucourt, R. , Bormann, D. , Heymès, R. , Perronnet, M. : Chemistry of Cefotaxime. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 63-67 (1980)

Casellas, J.M. , Ortiz, R.G. , Matteucci, A. , Iribarren, M.A. , Farinati, A. : Cefotaxime therapy of urinary tract infections. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 225-230 (1980)

Chamberlain, J. , Coombes, J.D. , Dell, D. , Franson, J.M. , Ings, R.J. , Macdonald, C.M. , McEwen, J. : Metabolism of cefotaxime in animals and man. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 69-78 (1980)

Cooper, M.J. , Anders, M.W. , Mirkin, B.L. : Ion-pair extraction and high-speed liquid chromatography of cephalothin and desacetyl cephalothin in human serum and urine. Drug Metab. Dispos. 1 : 659-662 (1973)

Cole, M. : Hydrolysis of Penicillin and related Compounds by the Cell-Bound Penicillin Acylase of Escherichia coli. Biochem. J. 115 : 733-739 (a) (1969)

Cole, M. : Deacylation of Acylamino Compounds other than Penicillins by the Cell-Bound Penicillin Acylase of Escherichia coli. Biochem. J. 115 : 741-745 (b) (1969)

Deutsches Institut für Normung e. V. : Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Entwurf November 1976. DIN 58940, Teil 3. Beuth Verlag. Berlin. (1976)

Drasar, F.A. , Farrell, W. , Howard, A.J. , Hince, C. , Leung, T. , Williams, J.D. : Activity of HR 756 against Haemophilus influencae, Bacteroides fragilis and Gram-negative rods. J. Antimicrob. Chemother. 4 : 445-45o (198o)

Ericson, H.M. , Sherris, J.C. : Antibiotic Sensitivity Testing. Report of an International Collaborative Study. Acta Path. Microb. Scand., Suppl. B : 1-9o (1971)

Erlansson, P. : Determination of the sensitivity in vito of bacteria to chemotherapeutic agents. Acta Path. Microb. Scand., Suppl. B : 85ff (1951)

Esmieu, F. , Guibert, J. , Rosengilde, H.C. , Ho, I. , Le Go, A. : Pharmacokinetics of cefotaxime in normal human volonteers. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 83-92 (198o)

Freiesleben, H. , Marre, R. : Vergleichende Resistenzbestimmungen gegen Sulfamethoxazol und Trimethoprim im Agar-Diffusionstest auf verschiedenen Nährmedien. Immun. und Infekt. 6 : 223-225 (1978)

Fu, K.P. , Aswapokee, P. , Ho, J. , Matthijssen, C. , Neu, H.C. : Pharmacocinetics of Cefotaxime. Antimicrob. Ag. Chemother. 16 : 592-597 (1979)

Grimm, H. : Vergleichende Regressionsanalysen von verschiedenen Antibiotika auf unterschiedlichen Nährböden. Immun. und Infekt. 6 : 244-248 (1978)

Hamilton-Miller, J.M.T. , Brumfitt, W. , Reynolds, A.V. : Cefotaxime (HR 756) a new cephalosporin with exceptionat broad-spectrum activity in vitro. J. Antimicrob. Chemother. 4 : 437-444 (1978)

Heymès, R. , Lutz, A. , Schrinner, E. : Experimental Evaluation of HR 756, a New Cephalosporin Derivate: Pre-Clinical Study. Infection 5, Nr 4 : 259-26o (1977)

Humphrey, J.H. , Lightbown, J.W. : A General Therory for Plate Assay of Antibiotics with some Practical Applications. J. Gen. Microbiol. 7 : 129-143 (1952)

Jenkinson, S.G. , Briggs, M.S. , Bryn, R.D. : Cefotaxime in the Threatment of pneumococcal pneumonia. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 177-18o (198o)

Karimi, A. , Seeger, K. , Stolke, D. , Knothe, H. : Cefotaxime concentrations in cerebrospinal fluid. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 119-12o (198o)

Knothe, H. , Dette, G.A. : Antibiotika in der Klinik. Aesopus Verlag. Basel, München (a) (198o)

Knothe, H. : Sensitivity testing and synergy. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 31-35 (b) (198o)

Kosmidis, J. , Stathakis, Ch. , Mantopoulos, K. , Pouriezi, T. , Papathanassiou, B. , Daikos, G.K. : Clinical pharmacology of Cefotaxime including penetration into bile, sputum, bone and cerebrospinal fluid. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 147-151 (198o)

Krasemann, C. , Brandis, H. : Beziehung zwischen minimaler Hemmhofkonzentration und Hemmhofdurchmesser. Immun. und Infekt. 6 : 24o-243 (1978)

Krasemann, C. , Hildenbrand, G. : Interpretation of agar diffusion tests. J. Antimicrob. Chemother. 6 : 181-187 (198o)

Labia, R. , Kazmierczak, A. , Guionie, M. , Masson, J.M. : Some bacterial proteins with affinity for cefotaxime. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 19-23 (198o)

Mitsuhashi, S. , Inoue, M. , Masuyoshi, S. : Antibacteral activity of cefotaxime. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 37-46 (198o)

Morel, C. , Monrocq, N. , Besnard, Y. : Concentrations of Cefotaxime in bronchial secretions. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 123-124 (198o)

Neu, H.C. , Aswapokee, N. , Aswapokee, P. , Fu, K.P. : HR 756, a New Cephalosporin Active Against Gram-Positive and Gram-Negative Aerobic and Anaerobic Bacteria. Antimicrob. Ag. Chemother. 15 : 273-281 (1979)

Neu, H.C. : The place of cephalosporins in antibacterial treatment of infectious diseases. J. antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 1-11 (a) (198o)

Neu, H.C. , Aswapokee, P. , Fu, K.P. , Ho, J. , Matthijssen, C. : Cefotaxime kinetics after intravenous and intramuscular injection of single and multiple doses. Clin. Pharm. Ther. 27 : 677-685 (b) (198o)

Newsom, S.W.B. , Matthews, J. , Pearce, V.R. : Cefotaxime for urinary tract infections. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 199-2o3 (198o)

O'Callaghan, C.H. , Muggleton, P.W. : The Formation of Metabolites from Cephalosporin Compounds. Biochem. J. 89 : 3o4-3o8 (1963)

O'Callaghan, C.H. : Description and classification of the newer cephalosporins and their relationships with the established compounds. J. Antimicrob. Chemother. 5 : 635-671 (1979)

Plaue, R. , Müller, O. , Fabricius, K. , Bethke, R.O. : Untersuchungen über die Diffusionsrate von Cefamandol in verschiedenen menschlichen Geweben. Arzneim. Forsch. 28 (II) : 2343-2349 (1978)

Plaue,R. , Müller, O. , Fabricius, K. , Bethke, R.O. : Vorläufiger Bericht über Cefoxitin-Spiegelbestimmungen in menschlichen Geweben. Infektion 7, Suppl. 1 : 8o-84 61979)

Reeves, D.S. , White, L.O. , Holt, H.A. , Bahari, D. , Bywater, M.J. , Bax, R.P. : Human metabolism of cefotaxime. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 93-1o1 (198o)

Richmond, M.H. : β-lactamase stability of cefotaxime. J. antimicrob, Chemother. 6, Suppl. A : 13-17 (198o)

Schrinner, E. , Limbert, M. , Penasse, L. , Lutz, A. : Antibacterial activity of cefotaxime and other newer cephalosporins (in vitro and in vivo). J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 25-3o (198o)

Shah, P.M. : Klinischer Einsatz der neuen Cephalosporine. Klinikarzt 8 : 193-199 (1979)

Simpson, J.S. : Microbiological Assay Using Large Plates Methods. in: Kavanagh, F. (ed): Analytic Microbiology. Academic Press. New York, London (1963)

Sjöberg, B. , Nathorst-Westfeld, L. , Örtengren, B : Enzymatic Hydrolysis of Some Penicillins and Cephalosporins by Escherichia coli Acylase. Acta Chem. Scand. 21 : 547-551 (1967)

Soussy, C.J. , Deforges, L.P. , Le Van Thoi, J. , Feghali, W. , Duval, J.R. : Cefotaxim concentrations in the bile and Wall of the gallbladder. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 125-13o (198o)

Sullivan, H.R. , McMahon, R.E. , Heiney, R.E. : The fate of parenteral cephalothin and related antibiotics in rat. The nature of a minor long-lived metabolite. J. Antibiot. 24 : 375-382 (1971)

Tiesler, E. , Okeke, J. : Vergleichende Spiegelbestimmungen einiger Cephalosporinderivate in Serum und in Gewebehomogenaten im Tierversuch. Klinikarzt 5 : 879-88o (1976)

Wiedemann, B. : Routinetests für die Empfindlichkeitsprüfung. Immun. und Infekt. 6 : 2o9-213 (1978)

Wise, R., Rollason, T. , Logan, M. , Andrews, J.M. , Bedford, K.A. : HR 756, a Highly Active Cephalosporin: Comparison with Cefazolin and Carbenicillin. Antimicrob. Ag. Chemother. 14 : 8o7-811 (1978)

Wise, R. , Baker, S. , Livingston, R. : Comparison of Cefotaxime and Moxalactam Pharmacokinetics and Tissue Levels. Antimicrob. Ag. Chemother. 18 : 369-371 (a) 6198o)

Wise, R. , Wills, P.J. , Andrews, J.M. , Bedford, K.A. : Activity of the Cefotaxime (HR 756) Desacetyl Metabolite and Other Cephalosporines. Antimicrob. Ag. Chemother. 17 : 84-86 (b) (198o)

Wright, W.E. , Frogge, J.A. : Hydrolysis of 3-Acetoxymethyl Cephalosporins by Lysed Whole Blood. Antimicrob. Ag. Chemother. 17 : 99-1oo (198o)

Young, J.P. , Husson, J.M. , Bruch, K. , Blomer, R.J. , Savopoulos, C. : The evaluation of efficicasy and safety of cefotaxime: a review of 25oo cases. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A : 293-3oo (198o)

Zeh, K.P. : Untersuchung zur Stabilität neuer Cephalosporine in Organhomogenaten und Enzymlösungen. Dissertation. Frankfurt am Main (1981)

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Knothe für die
Überlassung des Themas und die Bereitstellung
des Arbeitsplatzes.
Für die wissenschaftliche Leitung der Arbeit
danke ich Herrn Dr. G. A. Dette.
Für die Einweisung in die mikrobiologischen Techniken
danke ich Frau I. Beckmann.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

"Untersuchungen zur Stabilität des Cefotaxims in eingefrorenen Proben"

im Zentrum der Hygiene der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. H. Knothe, mit Unterstützung durch Dr. G. A. Dette, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Arbeit angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Kronshagen bei Kiel, den 28 Mai 1983

Lebenslauf

Am 08. Mai 1957 wurde ich als Sohn des Dr. ing. Heinrich van Laak und seiner Ehefrau Erni, geb. Schuppmann, in Offenbach am Main geboren.

Nach der Volksschule in Heusenstamm und Großauheim besuchte ich die Hohe Landesschule in Hanau am Main und legte dort im Mai 1976 das Abitur ab.

Im Juli 1976 wurde ich als Sanitätsoffiziersanwärter bei der Bundeswehr eingestellt und immatrikulierte mich zum Wintersemester 1976/77 an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main im Fachbereich Humanmedizin. Das Praktische Jahr leistete ich von Oktober 1981 bis zum Staatsexamen am 07. Oktober 1982 am Stadtkrankenhaus in Hanau am Main. Die Approbation als Arzt wurde mir am 15. Oktober 1982 erteilt.

Seit dem 01. November 1982 bin ich als Stabsarzt bei der Teilstreitkraft Marine in der Inneren Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses Kiel in Kronshagen bei Kiel tätig.

Im Mai 1981 heiratete ich Daniela Jacqueline Padell.

Kronshagen bei Kiel, den 28. Mai 1983

van Laak

Dekan: Prof. Dr. med. H. J. Müller
Referent: Prof. Dr. med. H. Knothe
Koreferent: Prof. Dr. med. W. Mondorf
Tag der mündlichen Prüfung: 2. Mai 1984